

(19) KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

KOREAN PATENT ABSTRACTS

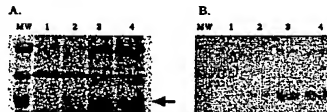
(11)Publication number: 1020020088841 A
(43)Date of publication of application: 29.11.2002

(21)Application number: 1020010027823
(22)Date of filing: 21.05.2001
(71)Applicant: ANGIOLAB, INC.
LEADBIO, INC
(72)Inventor: JANG, JAE YEONG
KIM, JEONG YUN
KIM, MIN YEONG
RYU, HO MYEONG
(51)Int. Cl. C12N 1/19

(54) EXPRESSION SYSTEM OF HUMAN TIMP-2(TISSUE INHIBITOR OF METALLOPROTEINASE-2) PROTEIN AND RECOMBINANT HUMAN TIMP-2 PROTEIN

(57) Abstract:

PURPOSE: Provided are an expression system of human TIMP-2(tissue inhibitor of metalloproteinase-2) protein and a recombinant human TIMP-2 protein. The recombinant human TIMP-2 protein can be useful for inhibition of cancer metastasis and treatment of diseases associated with angiogenesis.



CONSTITUTION: A transformed strain, which expresses a gene encoding the human TIMP-2 protein having the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1, is produced by transforming a wild type or mutant type *Yarrowia lipolytica* with a vector containing the TIMP-2 gene of SEQ ID NO: 1, wherein the transformed strain is YLTxIn, YLTyIn or YLTzIn; and the transformed strain is YLTxIn-pmr1(KCTC 18087P). The recombinant human TIMP-2 protein, which is expressed from the transformed strain capable of expressing the TIMP-2 gene of SEQ ID NO: 1, has the amino acid sequence of SEQ ID NO: 7.

© KIPO 2003

Legal Status

Date of final disposal of an application (20040624)

Date of registration (00000000)

Date of opposition against the grant of a patent (00000000)

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl. 7
C12N 1/19

(11) 공개번호 특2002-0088841
(43) 공개일자 2002년11월29일

(21) 출원번호 10-2001-0027823
(22) 출원일자 2001년05월21일

(71) 출원인 주식회사 안지오랩
대전광역시 서구 도마2동 439-6 배재대학교 바이오의약 연구센터(RRC) 자연과학관 413호
리드바이오 (주)
대전광역시 유성구 봉명동 535-5 유성한진리조트오피스텔 1721

(72) 발명자 김정운
대전광역시유성구궁동220충남대학교미생물학과
류호명
대전광역시유성구궁동220충남대학교미생물학과
장재영
대전광역시유성구궁동220충남대학교미생물학과
김민영
대전광역시 유성구 전민동 삼성푸른아파트 111-801

(74) 대리인 김원호
유미특허법인

심사청구 : 있음

(54) 인간 팀프-2 단백질 발현시스템 및 재조합 인간 팀프-2단백질

요약

본 발명은 인간 팀프-2 단백질 발현시스템 및 재조합 인간 팀프-2 단백질에 관한 것으로, 인간 팀프-2 단백질을 발현하는 재조합백터를 제조하고, 야로아이 리폴리티카 천연형 또는 돌연변이형에 상기 재조합 백터를 형질전환시켜 활성을 가진 재조합 인간 팀프-2 단백질을 발현, 정제시키는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 재조합 인간 팀프-2 단백질은 형질전환주에서 안정적으로 발현, 분비되었으며, 생물학적 활성을 유지하여 암세포의 전이억제제 또는 혈관신생 관련 질병치료제로 이용가능성이 높다.

대표도
도 3

색인어

탐프-2 유전자, 야로이아 리폴리티카

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명의 재조합벡터 pTimpX-Ar, pTimpY-Ar, 및 pTimpZ-Ar의 구조도이고,

도 2는 본 발명의 형질전환주(YLTxIn, YLTyIn, YLTzIn) 배양물의 SDS-PAGE 사진(A) 및 웨스턴 블롯 사진(B)이고,

도 3은 본 발명의 YLTxIn-pmr1 균주 배양물의 SDS-PAGE 사진(A) 및 웨스턴 블롯 사진(B)이고,

도 4는 YLTxIn-pmr1 균주에서 정제된 재조합 인간 탐프-2 단백질을 SDS-폴리아크릴아미드 젤 전기영동으로 분석한 것이고,

도 5는 재조합 인간 탐프-2 단백질의 MMP-2 효소 억제정도를 도시한 것이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 인간 탐프-2 단백질 발현시스템 및 재조합 인간 탐프-2 단백질에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 인간 탐프-2 단백질을 발현하는 재조합벡터를 제조하고, 야로이아 리폴리티카 천연형 또는 돌연변이형에 상기 재조합 벡터를 형질전환시켜 활성을 가진 재조합 인간 탐프-2 단백질을 발현, 정제시키는 방법에 관한 것이다.

유전공학 기술을 이용하여 재조합 단백질을 생산하기 위한 유전자 발현 숙주로 원핵세포인 대장균 (*E. coli*)과 진핵세포인 사카로마이세스 세레비시애(*Saccharomyces cerevisiae*)가 주로 이용되어 왔다. 상기 재조합 단백질 발현 시스템은 여러 가지 장점이 있음에도 불구하고, 숙주/벡터 시스템들에서는 발현이 되지 않거나 발현 및 분비효율이 매우 낮은 재조합 단백질들이 많이 있다. 따라서, 기존의 발현 시스템으로는 발현이 되지 않는 재조합 단백질들을 발현하기 위해서는 보다 다양한 숙주/벡터 발현 시스템 개발이 필요하다.

상기한 이유로 비전통 효모인 피키아 패스토리스(*Pichia pastoris*), 클루베로마이세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*), 한세룰라 폴리모르파(*Hansenula polymorpha*), 야로이아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*) 등을 이용한 재조합 단백질 발현 시스템 개발 연구가 활발하게 이루어지고 있다.

야로이아 리폴리티카는 이형전환 효모로서 오래전부터 구연산(citric acid), 이소프로필말릭산(isopropylmalic acid), 에리트ρί톨(erythritol), 맨니톨(mannitol) 등을 생산하는데 사용되고 있다. 야로이아 리폴리티카는 라이신 대사, 알칸의 이용, 포자생성기작 등과 같은 유전학적, 생리학적 연구가 이루어져 있으며, 자기복제염기서열(autonomously replicating sequence; ARS)을 비롯한 DNA 복제에 대한 연구들도 많이 수행되어 있다.(Wang 등, *Yeast*, 14, 1373-1386, 1998; Vernis 등, *Mol. Cell. Biol.* 17, 1995-2004, 1997) 또한 단백질 분비 및 분비신호 인지인자, 펄럭시즘 생성에 관한 연구(Boisrame 등, *J. Biol. Chem.* 273, 30903-30908, 1998; Mamoun 등, *J. Biol. Chem.* 274, 11296-11302, 1999; Titorenko 등, *Mol. Cell. Biol.* 18, 2789-2803, 1998)도 활발히 진행되고 있어 야로이아 리폴리티카는 기초연구와 응용연구 모두가 활발히 수행되고 있는 매우 유용한 산업효모이다.

한편, 야로이아 리폴리티카는 알칼리성 단백질분해효소(alkaline extracellular protease; AEP), 산성 단백질분해효소(acid extracellular proteases; AXP), RNA 분해효소(RNase) 같은 비교적 분자량이 큰 단백질을 세포 밖으로 대량으로 분비할 수 있어, 유용한 재조합 단백질을 생산하기 위한 숙주로서 특별한 관심을 모으고 있다.(Park 등, J. Bio l. Chem. 272, 6876-6881, 1997)

재조합 단백질의 세포의 분비에는 신호서열(signal sequence)이 매우 중요한 역할을 한다. 야로이아 리폴리티카에서 재조합 단백질을 세포 외로 분비시킬 때는 알칼라인 단백질분해 효소(AEP)의 분비신호서열이 많이 이용되고 있다. 알칼라인 단백질분해 효소의 분비신호는 15개의 아미노산으로 이루어진 프리서열(pre-sequence), 다이펩티딜 아미노 펩티데이즈(dipeptidyl aminopeptidase)에 의해 절단되는 9개의 Xaa-알라닌 또는 Xaa-프롤린 다이펩티드 서열, 그리고 122개의 아미노산으로 이루어진 프로서열(pro-sequence)로 되어있다.(Matoba 등, Microbiology, 143, 326 3-3272, 1997)

한편, 암환자 사망의 주 원인은 전이로, 암세포가 일차 종양괴로부터 분리되어 해부학적으로 먼곳에 있는 조직이나 장기에 착상하여 성장하는 것이다.(Sugarbaker, Weingard and Roseman; Cancer Invasion and Metastasis(L.A. Liotta and I.R. Hart ed.) Boston, Nijhoff. 1982. PP 427-465) 암의 치료를 향상시키기 위하여 화학요법이나 면역요법들을 이용되고 있으나, 일부 종양에서 어느정도 효과를 거두고 있을 뿐 암의 전이로 암 환자의 생존율을 높이는 데 큰 역할을 하지 못하고 있다.

암세포가 전이하려면 우선 암세포가 주위조직으로 침습해 들어가야 한다. 정상적인 상피세포는 기저막(basement membrane)에 의해 둘러싸여 주위 간질로부터 격리 되어 있으며, 혈관내피세포 밖의 기저막은 암세포가 혈관으로부터 조직 실질로 침투하는데 장벽이 되므로 기저막은 암세포 침윤에 대한 일차 방어벽이 된다. 따라서, 기저막 붕괴는 전이가 일어남을 나타내는 신호이다.

전이성 암세포에서 활성이 증가되는 효소 중 MMP-2와 MMP-9는 매트릭스 메탈로프로테이네이즈계에 속하는 효소이며, 기저막의 주요골격을 이루고 있는 타입 IV 콜라젠을 특이적으로 붕괴시키고 암의 전이와 직접적인 관계가 있다고 여러 연구에서 보고되고 있다.(Garbisa et al. Cancer Res 47, 1523-1528(1987) ; Ostrowski et al. Mol carcinogenesis 1, 13-19(1988) ; Liotta et al. Nature 284, 67-68(1980)) 그러나, MMP가 활성화되더라도 티프(TIM; Tissue Inhibitor of Metalloproteinase)와 같은 천연의 억제제가 존재하면 기질과 반응하지 못한다.

한편, 티프-2(Tissue inhibitor of metalloproteinase-2; TIMP-2) 단백질은 암세포의 전이(metastasis)와 혈관신생(angiogenesis)에 중요한 역할을 하고 있는 매트릭스 메탈로프로테이네이즈(Matrix metalloproteinase; 이하 "MMP" 라고 함)효소의 저해제이다. 티프는 생체에 존재하고 있는 천연의 MMP억제제로서 티프-1,2,3의 세가지 종류가 보고되었으며, 12개의 시스테인이 디설파이드결합을 이루어 6개의 루프(loop)와 2개의 도메인(domain)을 형성한다.

티프-2는 티프-1과 아미노산서열상 40 %의 상동성을 가지며 MMP-2의 잠복형(pro form) 및 활성형(active form)과 결합하고, 활성형의 모든 MMP를 억제한다고 보고되고 있다. 따라서 티프-2는 MMP효소를 억제하는 활성이 있으므로 암세포의 전이억제를 통한 암의 치료 또는 혈관신생과 연관이 있는 질병 치료제로 사용될 수 있다.

그러나, 티프-2는 대량생산이 어렵고, 대장균 발현시 봉입체(inclusion body)로 발현되어 단백질 리폴딩(refolding) 과정이 필요하고 회수율이 낮은 문제로 인하여 의약적 용도로 사용되지 못하고 있다. 또한 본 발명자들의 연구에 의하면 사카로마이세스 세레비지에에서 티프-2를 발현시키면 수용성으로 발현되지만 발현 효율이 매우 낮아 효율이 크게 떨어진다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명은 인간 팀프-2 단백질을 효율적으로 발현시킬 수 있는 재조합백터를 제공하는 것을 목적으로 한다.

또한 본 발명은 인간 팀프-2 단백질을 효율적으로 발현시킬 수 있는 형질전환 숙주를 제공하는 것을 목적으로 한다.

또한 본 발명은 생물학적 활성을 가지는 재조합 인간 팀프-2 단백질을 제공하는 것을 목적으로 한다.

발명의 구성 및 작용

상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 서열번호 1의 인간 팀프-2 유전자를 발현하는 형질전환주를 제공한다.

또한 본 발명은 상기의 형질전환주에서 발현된 서열번호 7의 재조합 인간 팀프-2 단백질을 제공한다.

이하 본 발명을 상세하게 설명한다.

본 발명은 인간 팀프-2를 발현하는 재조합백터를 제조하였다. 상기 재조합백터는 pTimpX-PT, pTimpY-PT, pTimpZ-PT이다. 재조합백터는 동일한 서열번호 1의 인간 팀프-2 유전자를 포함하나, 각기 다른 단백질 분비신호를 포함한다. 하기 표 1에 3종의 재조합백터의 구성을 기재하였다.

[표 1]

	pTimpX-PT	pTimpY-PT	pTimpZ-PT
분비신호	AEP 프리신호서열(서열번호 2)	AEP 프리-다이펩티드신호서열(서열번호 3)	AEP 프리-다이펩티드-프로신호서열(서열번호 4)
프로모터	XPR2 프로모터(서열번호 5)	XPR2 프로모터(서열번호 5)	XPR2 프로모터(서열번호 5)
유전자	팀프-2(서열번호 1)	팀프-2(서열번호 1)	팀프-2(서열번호 1)
전사종결신호	XPR2 터미네이터(서열번호 6)	XPR2 터미네이터(서열번호 6)	XPR2 터미네이터(서열번호 6)

상기 pTimpX-PT, pTimpY-PT, pTimpZ-PT는 야로이아 리폴리티카에 형질전환시켜 형질전환주 YLTXIn, YLTYIn, YLTZIn를 제조하였다.

또한 본 발명은 pTimpX-PT를 pmr1 돌연변이 야로이아 리폴리티카에 형질전환시킨 YLTXIn-pmr1 균주를 제조하였다. 상기 Pmr 1 단백질은 효모의 P형 Ca^{2+} -ATPase의 일종으로서 골지체에 위치하고 있으며, 세포내의 칼슘과 망간 이온의 농도 조절에 관여하는 단백질로 알려져 있다.(Rudolph 등, Cell, 58, 133-145, 1989; Antebi와 Fink, Mol. Biol. Cell, 3, 633-654, 1992) 세포 내에서 칼슘과 망간 이온은 많은 생리 대사에 관여하기 때문에 이 이온들의 세포내 농도 밸런스가 파괴되었을 때에는 여러가지 돌연변이 형질들이 나타나게 된다.(Durr 등, Mol. Biol. Cell, 9, 1149-1162, 1998; Lapinskas 등, Mol. Cell. Biol., 15, 1382-1388, 1995) 그러한 돌연변이 형질로 인하여 단백질을 과량으로 분비하는 특징을 가지기도 하는데(Smith 등, Science, 229, 1219-1224, 1985; Harmsen 등, Appl. Microbiol. Biotechnol., 46, 365-370, 1996), 단백질의 종류에 따라 분비효율의 차이가 있다. 따라서, 본 발명의 pTimpX-PT를 pmr1 돌연변이 야로이아 리폴리티카에 형질전환시켜 YLTXIn-pmr1의 분비효율을 확인한 결과 YLTXIn, YLTYIn, YLTZIn에 비해 높은 분비효율을 가짐을 확인할 수 있었으며, 상기 YLTXIn-pmr1을 유전자은행에 KCTC 18087P로 기탁하였다.

본 발명의 형질전환주(YLTXIn, YLTYIn, YLTZIn, YLTXIn-pmr1)는 배양배지(아미노산 결핍 효모 질소베이스 0.67 %, 글루코스 2 %, 아데닌 30 mg/liter)에서 유지시키는 것이 바람직하고, 발현배지(효모추출물 1 %, 글루코스 1 %, 프로테오스 펩톤 5 %, 50 mM 소듐 포스페이트완충액 pH 6.8)상에서 2일간 28 °C로 배양하여 서열번호 7의 재조합 인간 팀프-2 단백질을 발현, 분비시키는 것이 바람직하다. 상기 재조합 인간 팀프-2 단백질은 인간 팀프-2 단백질을 활성단백질로 포함하는 상기 형질전환주에서 발현되는 다양한 형태의 단백질이다.

본 발명의 재조합 인간 팀프-2 단백질은 배양액을 원심분리하고 이온교환그래피를 실시하여 분리하였다. YLTxIn은 약 21 kDa의 재조합 인간 팀프-2 단백질을 발현하고, YLTyIn은 약 23 kDa의 다이펩티드를 포함하는 재조합 인간 팀프-2 단백질을 발현하고, YLTzIn은 약 36 kDa의 분비신호(pro-dipeptide-pre signal sequence)를 포함하는 재조합 인간 팀프-2 단백질을 발현하고, YLTxIn-pmr1은 약 21 kDa의 재조합 인간 팀프-2 단백질을 발현하였다. 상기 4종의 형질전환주 중 YLTxIn-pmr1이 가장 많은 양의 재조합 인간 팀프-2 단백질을 발현시켰다.

본 발명의 재조합 인간 팀프-2 단백질은 상기 4종의 형질전환주에서 분리하여 의학적인 용도로 사용하는 것이 바람직하다. 상기 재조합 인간 팀프-2 단백질은 인간 팀프-2 단백질을 활성단백질로 포함하는 상기 형질전환주에서 발현되는 다양한 형태의 단백질이 바람직하고, 가장 바람직하게는 YLTxIn 및 YLTxIn-pmr1에서 발현된 재조합 인간 팀프-2 단백질이다. 또한 분비신호를 포함하는 재조합 인간 팀프-2 단백질 역시 팀프-2 활성을 가지므로 의학적인 용도로 사용할 수 있다. 재조합 인간 팀프-2 단백질은 바람직하게는 암세포의 전이억제제 또는 혈관신생과 연관된 질병치료제로 활용될 수 있다.

이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐 본 발명이 하기의 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[실시예 1] 재조합백터의 제조

야로이아 리폴리티카에서 팀프-2를 발현하기 위해서 재조합백터를 제조하였다. 프로모터와 터미네이터는 알칼라인 단백질분해 효소(alkaline extracellular protease; AEP)를 코딩하는 XPR2 유전자의 프로모터/터미네이터를 사용하였다. 단백질 분비신호는 AEP 분비신호를 이용하였다. 상기 AEP 분비신호는 서열번호 2의 프리신호서열(pre signal sequence), 서열번호 3의 다이펩티드신호서열(dipeptide signal sequence), 서열번호 4의 프로신호서열(pro signal sequence)을 포함하여 각 3부분을 조합하여 3종의 재조합백터를 제조하였다. 도 1은 본 발명에서 제조한 팀프-2를 발현하는 3종의 재조합백터의 구조도를 도시한 것이다.

(1) pTimpX-Ar 백터의 제조

pTimpX-Ar 백터는 XPR2 프로모터-AEP 프리신호서열-팀프-2 유전자-터미네이터를 포함한다.

pAUX1 플라스미드(우문희, 석사학위논문, 충남대학교, 1996)를 주형으로 서열번호 8의 프라이머(5' 프라이머, EcoRV 부위포함)와 서열번호 9의 프라이머(3' 프라이머)로 PCR하여, AEP 분비신호(프리서열)를 증폭시켜 수득하였다. 또한 pMY2 플라스미드((주)안지오랩)를 주형으로 서열번호 10의 프라이머(5' 프라이머, 서열번호 9의 프라이머와 15개의 상보적인 염기서열 포함)와 서열번호 11의 프라이머(3' 프라이머, Hind III 부위 포함)로 PCR하여 팀프-2 유전자를 수득하였다. 상기에서 수득한 분비신호 절편과 팀프-2 유전자절편은 분비신호서열의 3' 말단과 팀프-2 유전자의 5' 말단이 서로 상보적이므로, 서열번호 8의 프라이머와 서열번호 11의 프라이머로 PCR하여 분비신호절편과 팀프-2 유전자절편이 연결된 PCR 산물을 수득하였다. 상기 PCR 산물은 양 말단에 EcoRV와 HindIII 절단부위를 가지고 있어, 동일한 제한효소 절단부위를 포함하는 pBS-PT 백터에 클로닝하여 pTimpX-PT 재조합백터를 제조하였다. 상기 pBS-PT는 XPR2 전사종결신호를 포함하고 있다.

pTimpX-PT 벡터로부터 XPR2 프로모터:프리신호서열:팀프-2 유전자:XPR2 터미네이터를 포함하는 EcoRI/EcoRI 절편을 pAU-Ar 벡터(우문희, 석사학위논문, 충남대학교, 1996)의 EcoRI 자리에 삽입하여 pTimpX-Ar를 제조하였다.

(2) pTimpY-Ar 벡터의 제조

pTimpY-Ar 벡터는 XPR2 프로모터-AEP 다이펩타이드신호서열-팀프-2 유전자-터미네이터를 포함한다.

pAUX1 플라스미드(우문희, 석사학위논문, 충남대학교, 1996)를 주형으로 서열번호 8의 프라이머(5' 프라이머, EcoRV 부위포함)와 서열번호 12의 프라이머(3' 프라이머)로 PCR하여, AEP 분비신호(프리-다이펩타이드서열)를 증폭시켜 수득하였다. 또한 pMY2 플라스미드((주)안지오랩)를 주형으로 서열번호 13의 프라이머(5' 프라이머, 서열번호 12의 프라이머와 15개의 상보적인 염기서열 포함)와 서열번호 11의 프라이머(3' 프라이머, Hind III 부위 포함)로 PCR하여 팀프-2 유전자를 수득하였다. 상기에서 수득한 분비신호 절편과 팀프-2 유전자절편은 분비신호서열의 3' 말단과 팀프-2 구조유전자의 5' 말단이 서로 상보적이므로, 서열번호 8의 프라이머와 서열번호 11의 프라이머로 PCR하여 분비신호절편과 팀프-2 유전자절편이 연결된 PCR 산물을 수득하였다. 상기 PCR 산물은 양 말단에 EcoRV와 HindIII 절단부위를 가지고 있어, 동일한 제한효소 절단부위를 포함하는 pBS-PT 벡터에 클로닝하여 pTimpY-PT 재조합벡터를 제조하였다. 상기 pBS-PT는 XPR2 전사종결신호를 포함하고 있다.

pTimpY-PT 벡터로부터 XPR2 프로모터:AEP 분비신호:팀프-2 유전자:XPR2 터미네이터를 포함하는 EcoRI/EcoRI 절편을 pAU-Ar 벡터(우문희, 석사학위논문, 충남대학교, 1996)의 EcoRI 자리에 삽입하여 pTimpY-Ar를 제조하였다.

(3) pTimpZ-Ar 벡터의 제조

pTimpZ-Ar 벡터는 XPR2 프로모터-AEP 분비신호-팀프-2 유전자-터미네이터를 포함한다.

pAUX1 플라스미드(우문희, 석사학위논문, 충남대학교, 1996)를 주형으로 서열번호 8의 프라이머(5' 프라이머, EcoRV 부위포함)와 서열번호 14의 프라이머(3' 프라이머)로 PCR하여, AEP 분비신호(프리-다이펩타이드-프로서열)를 증폭시켜 수득하였다. 또한 pMY2 플라스미드((주)안지오랩)를 주형으로 서열번호 15의 프라이머(5' 프라이머, 서열번호 14의 프라이머와 15개의 상보적인 염기서열 포함)와 서열번호 11의 프라이머(3' 프라이머, Hind III 부위 포함)로 PCR하여 팀프-2 유전자를 수득하였다. 상기에서 수득한 분비신호 절편과 팀프-2 유전자절편은 분비신호서열의 3' 말단과 팀프-2 구조유전자의 5' 말단이 서로 상보적이므로, 서열번호 8의 프라이머와 서열번호 11의 프라이머로 PCR하여 분비신호절편과 팀프-2 유전자절편이 연결된 PCR 산물을 수득하였다. 상기 PCR 산물은 양 말단에 EcoRV와 HindIII 절단부위를 가지고 있어, 동일한 제한효소 절단부위를 포함하는 pBS-PT 벡터에 클로닝하여 pTimpZ-PT 재조합벡터를 제조하였다. 상기 pBS-PT는 XPR2 전사종결신호를 포함하고 있다.

pTimpZ-PT 벡터로부터 XPR2 프로모터:AEP 분비신호:팀프-2 유전자:XPR2 터미네이터를 포함하는 EcoRI/EcoRI 절편을 pAU-Ar 벡터(우문희, 석사학위논문, 충남대학교, 1996)의 EcoRI 자리에 삽입하여 pTimpZ-Ar를 제조하였다.

[실시예 2] 형질전환주 제조

실시예 1에서 제조된 pTimpX-Ar, pTimpY-Ar, pTimpZ-Ar을 PMR1 야생형 야로이아 리폴리티카(SMS397A; Park 등, J. Biol. Chem. 272, 6876-6881, 1997)에 리튬 아세테이트(lithium acetate) 방법(Gaillardin 등, Curr. Genet., 10, 49-58, 1985)으로 형질도입하고, 각 발현벡터가 염색체에 안정적으로 삽입되었는지 서든블릿 분석에 의해 확인하였다.

pTimpX-Ar, pTimpY-Ar, pTimpZ-Ar로 형질전환된 재조합 야로이아 리폴리티카는 각각 YLTXIn, YLTyIn, YLTZIn로 명명하였다. 상기 형질전환주는 발현배지(Yeast extract 1 %, Glucose 1 %, Proteose peptone 5 %, 50 mM sodium phosphate buffer pH 6.8)에서 28 °C로 2일간 배양한 후 10 배로 농축한 배양상등액 10 ul 을 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동으로 분석하였다. 발현배지상의 프로테오즈 펩톤은 XPR2 프로모터의 단백질 발현을 유도하는 물질이다.

도 2는 본 발명의 형질전환주 배양액을 SDS-PAGE 한 것(A)으로, MW는 분자량마커이고, 레인 1 및 레인 2는 YLTXIn의 배양상등액이고, 레인 3 및 레인 4는 YLTyIn의 배양상등액이고, 레인 5 내지 레인 6은 YLTZIn의 배양상등액이고, 레인 7은 야로이아 리폴리티카(SMS397A)의 배양상등액이다. YLTXIn 및 YLTyIn에서는 약 21 KDa과 23 KDa 정도의 단백질이 확인되었으나, YLTZIn에서는 재조합단백질 발현유무가 쉽게 확인되지 않았다. 팀프-2 단백질은 그 크기가 21 KDa 이므로, YLTXIn는 AEP 분비신호가 제거된 팀프-2 단백질을 발현하고, YLTyIn는 AEP 분비신호(프리:다이펩티드신호서열)에서 프리서열만 제거되고 다이펩티드서열(약 2 KDa)을 포함하는 팀프-2 단백질을 발현하는 것으로 추정되었다.

상기 발현된 단백질에 대한 팀프-2 항체를 이용한 웨스턴 블롯 분석을 실시하였다. 도 2의 B는 도 2의 A의 전기영동 겔을 웨스턴블롯한 사진으로, YLTXIn, YLTyIn, YLTZIn에서 발현된 단백질들은 팀프-2 항체에 결합하여 팀프-2 단백질임을 확인할 수 있었다. YLTZIn은 균주 배양상등액의 단백질 전기영동 분석에서는 확실하지 않았으나, 웨스턴 분석 결과 프로시그널서열이 제거되지 않은 상태의 팀프-2 (약 36 KDa)가 미량 분비된 것을 알 수 있었다.

따라서, YLTXIn, YLTyIn 및 YLTZIn가 팀프-2를 발현하고 분비시키고, 세 가지의 분비신호 모두가 팀프-2 단백질 분비에 유용하다는 것을 확인하였다. 그러나, 프로신호서열은 팀프-2 단백질의 분비에 효율적이지 않을 뿐만 아니라, 프로신호서열과 다이펩티드신호서열은 프로세싱이 올바르게 일어나지 않아서 인간 팀프-2 단백질만을 생산하기에는 적합하지 않은 것으로 생각되었다. 따라서, 프리신호서열을 이용하여 팀프-2를 분비하는 벡터인 pTimpX-Ar를 사용하여 팀프-2 단백질을 더 효율적으로 발현분비하는 재조합 균주를 제조하기로 하였다.

[실시예 3]

인간 팀프-2 단백질이 pmr1 돌연변이 야로이아 리폴리티카에서 과량으로 분비되는지를 알아보기 위해서, pTimpX-Ar 벡터를 pmr1 돌연변이주 (CS3; Sohn 등, J. Bacteriol., 180, 6736-6742, 1998)에 도입하여 팀프-2 발현 pmr1 돌연변이 형질전환체 YLTyIn-pmr를 제조하였다. 서든블롯을 수행하여 pTimpX-Ar 벡터가 염색체에 안정적으로 삽입된 것을 확인한 후 팀프-2 분비 양상을 조사하였다.

팀프-2 발현 YLTXIn 균주(PMR1 양생형)와 YLTXIn-pmr1 균주(pmr1 돌연변이)를 프로테오즈 펩톤이 2 % 첨가된 배지에서 28 °C에서 2일 동안 배양한 후 배양상등액을 단백질 전기영동으로 분석하였다. 도 3의 A는 YLTXIn과 YLTXIn-pmr1의 배양상등액을 SDS-PAGE한 것이고, B는 A의 SDS-PAGE를 웨스턴블롯한 것으로, 레인 1은 야로이아 리폴리티카(SMS397A)이고, 레인 2는 YLTXIn이고, 레인 3 및 레인 4는 YLTXIn-pmr1이다. YLTXIn-pmr1은 YLTXIn에 비해 많은 팀프-2 단백질(약 21 kDa)을 발현하였고, 상기한 결과로 야로이아 리폴리티카 pmr1 돌연변이 균주가 인간 팀프-2 단백질을 생산하는데 매우 유용한 균주임을 확인할 수 있었다. 상기 YLTXIn-pmr11 균주는 2001년 3월 23일자로 유전자은행에 기탁번호 KCTC 18087P로 기탁하였다.

[실시예4] 재조합 인간 팀프-2 단백질의 정제

YLTXIn-pmr1을 발현배지에서 2일간 28 ℃로 배양하고, 배양액을 10,000 xg에서 10분간 원심분리하였다. 상등액을 20 mM 트리스 아세테이트(pH 6.5)에서 투석(spectrum)하였다. 투석물을 여과하고, SP-세파로즈(Pharmacia 사)를 20 mM 트리스 아세테이트(pH 6.5)로 세척한 다음 컬럼(1.6 x 5 cm)에 충전하였다. 여과물을 컬럼에 주입하고 20 mM 트리스 아세테이트(pH 6.5)로 세척한 다음 20 mM 트리스 아세테이트 Tris-acetate(pH 6.5) 및 0.5 M NaCl 으로 선형으로 농도를 증가시켜 FPLC(fast protein liquid chromatography, Pharmacia)를 실시하였다. 280 nm에서의 흡광도를 측정하고, 검출된 각 피크를 SDS-PAGE로 분석하여 0.25 M NaCl에서 용출된 인간 팀프-2 단백질을 분리하였다. 도 4는 재조합 인간 팀프-2 단백질의 SDS-PAGE 사진이다.

[실시예 5] 재조합 인간 팀프-2 단백질의 활성측정

실시예 4의 재조합 인간 팀프-2 단백질이 매트릭스 메탈로프로테아제(MMP) 억제능을 포함하는지 여부를 분광형광계(Perkin-Elmer사 LS50B)로 측정하였다. 특히 혈관신생과 전이에 중요한 역할을 하는 MMP-2의 활성억제를 측정하기 위하여 기질로는 Mca-Pro-Leu-Gly-Leu-Dap(Dnp)-Ala-Arg-NH₂ (Bachem사 Cat. No. M-1895)를 사용하였고, 효소는 바쿨로바이러스 시스템(Baculovirus system) 유래의 MMP-2 단백질을 사용하였다.

완충용액(50 mM Tricine(pH 7.5), 10 mM CaCl₂, 200 mM NaCl)에서 2분 간격으로 여기파장 280 nm, 방사파장 360 nm에서 형광도를 측정하였다. 기질과 효소를 포함하는 완충용액에 재조합 인간 팀프-2 단백질 2.5 ug과 5 ug을 혼합하고, 대조군과 함께 형광도를 측정하여 도 7에 나타내었다. 2.5ug의 인간 팀프-2 단백질은 MMP-2활성을 51 %, 5 ug의 인간 팀프-2 단백질은 MMP-2활성을 92 % 억제하였다.

발명의 효과

상기에 언급한 바와 같이, 본 발명은 인간 팀프-2 발현시스템을 확립하였고, 활성을 가지는 인간팀프-2 단백질을 정제하였다. 또한 pmr1 돌연변이 야로이아 리폴리티카 균주가 인간 팀프-2 단백질 발현에 유용한 숙주임을 확인하였다. 본 발명의 인간 팀프-2 단백질은 암세포의 전이억제제 또는 혈관신생과 연관이 있는 질병 치료제로 사용될 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

서열번호 1의 인간 팀프-2 유전자를 발현하는 형질전환주.

청구항 2.

제 1항에 있어서, 상기 형질전환주는 야로이아 리폴리티카(Yarrowia lipolytica)의 천연형 또는 돌연변이형에 서열번호 1의 팀프유전자를 포함하는 벡터로 형질전환되어진 것을 특징으로 하는 형질전환주.

청구항 3.

제 1항에 있어서, 상기 형질전환주는 YLTXIn, YLTYIn 또는 YLTYIn인 것을 특징으로 하는 형질전환주.

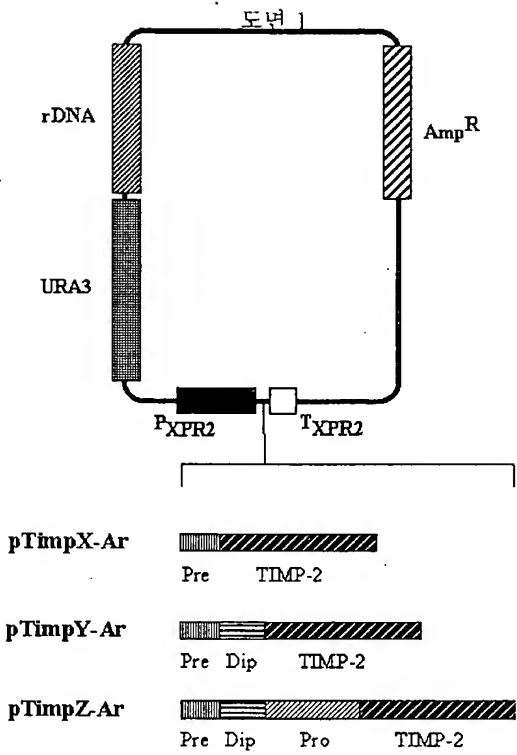
청구항 4.

제 1항에 있어서, 상기 형질전환주는 YLTXIn-pmr1(KCTC 18087P)인 것을 특징으로 하는 형질전환주.

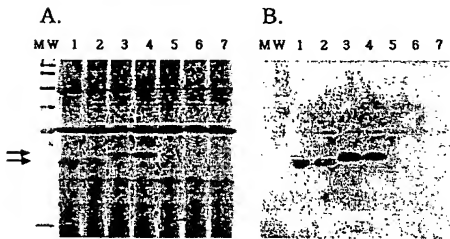
청구항 5.

제 1항의 형질전환주에서 발현된 서열번호 7의 재조합 인간 팀프-2 단백질.

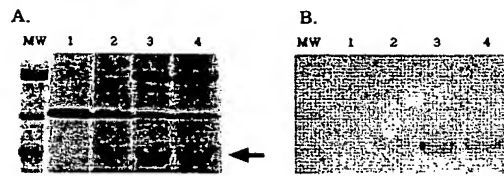
도면



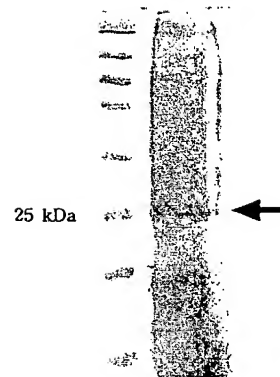
도면 2



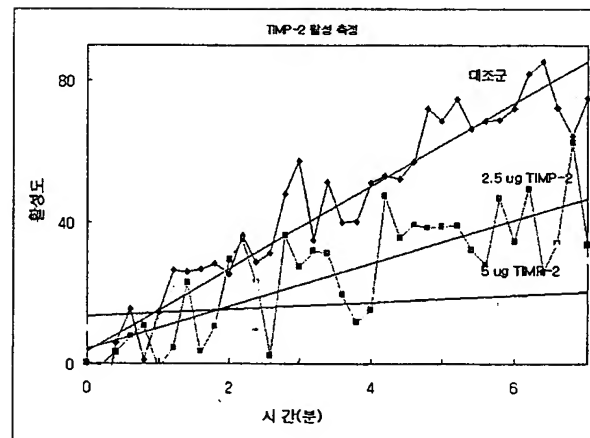
도면 3



도면 4



도면 5



LeadBio, Inc

<120> EXPRESSION SYSTEM OF HUMAN TIMP-2 PROTEIN AND RECOMBINANT HUMAN
TIMP-2 PROTEIN

<160> 15

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 590

<212> DNA

<213> Human TIMP-2 gene

<400> 1

tgcagctgct ccccggtgca cccgcaacag gcgttttgca atgcagatgt agtgatcagg	60
gccaaagcgg tcagtggagaa ggaagtggac tctggaaacg acatttatgg caaccctatc	120
aagaggatcc agtatgagat caagcagata aagatgttca aagggcctga gaaggatata	180
gagtttatct acacggcccc ctccctcggca gtgtgtgggg tctcgtctga cgttgaggga	240
aagaaggaat atctcattgc aggaaggcc gagggggacg gcaagatgca catcaccctc	300
tgtgacttca tctgtccctg ggacaccctg agcaccacc agaagaagag cctgaaccac	360
aggtaccaga tgggctgcga gtgcaagatc acgcgctgcc ccatgatccc gtgctacatc	420
tcctccccgg acgagtgcct ctggatggac tgggtcacag agaagaacat caacgggcac	480
caggccaagt tcttcgcctg catcaagaga agtgacggct cctgtgcgtg gtaccgcggc	540
gcggcgcccc ccaagcagga gtttctcgac atcgaggacc cataagcaga	590

<210> 2

<211> 57

<212> DNA

<213> pre-region of XPR2 signal sequence

<400> 2

atgaagctcg ctaccgcctt tactattctc actgccgttc tggccgctcc cctggcc	57
--	----

<210> 3

<211> 99

<212> DNA

<213> Pre+diptide-region of XPR2 signal sequence

<400> 3

atgaagctcg ctaccgcctt tactattctc actgccgttc tggccgctcc cctggccgcc	60
cctgccccctg ctccctgatgc tgccccctgct gctgtgcct	99

<210> 4

<211> 471

<212> DNA

<213> Pre+diptide+pro-region of XPR2 signal sequence

<400> 4

atgaagctcg ctaccgcctt tactattctc actgccgttc tggccgctcc cctggccgcc	60
cctgccccctg ctccctgatgc tgccccctgct gctgtgcctg agggccctgc cgccgctgcc	120
tactcatcta ttctgtccgt ggctcgctaag cagtccāaga agtttaagca ccacaagcga	180
gatcttgatg agaaggatca gttcatcggt gtcttttgaca gtagcgctac tgttgaccag	240
atcgccctccg aaatccagaa gctggactct ctggctcgac aggactcgtc caacggtatc	300
acctctgctc ttgatcttcc tgtctacacg gatggatctg gctttctcgg atttgttggga	360
aagtccaact ccactatcgt tgacaagctc aaggagtcgt ctgttctgac ggtcgagccc	420
gataccattg tgtctctccc cgagattcct gcttcttcta atgccaagcg a	471

<210> 5

<211> 957

<212> DNA

<213> XPR2 promoter sequence

<400> 5
tagagcagca acgcgtggag agtttgggtt ttgggttacg tacgtagagc cgtttgatag 60
atggtacatc caccggctag cggaacacag tgtcaagaca agcctgcaac acagtcataa 120
tattttcgat attcaggcgt atcagggtaca atctgaggtg tctcacaagt gccgtgcagt 180
cccccccca cttgcttctc tttgtgtgta gtgtacgtac attatcgaga ccgttggtcc 240
cgccacctc gatccggggt cctatgcatc cctgaaacat tgattggaaa ttaacatatg 300
agctgcgtgc tttttgcatt caagggcgca gcttatcttg tatccttaat tacacatgac 360
ctcttgagcg ccacggtaca ttcttggcgt cagttcggtg gagcggacac tttctctcc 420
tttgtctgac atgttggtta agttgtagtc caggacaca aggggttcca acggcagtg 480
cagcctacc cagcctacc accactggcc ctggtctaac ttcgacgac gccatcagg 540
ttcatggata ggcggtgtga tttacgatgt gatggacaat gttagagaga tcccactact 600
tgtagtcagg ccatctttta cgtacgcact gtaccatgat gtcaatggag tatgatgaac 660
cgactttgag agactcacat ctgcacaaca ccatgtttca gcggaatccg acttccaacc 720
caaacccaag cccctgtcag atatcgtgag aaggcacggc accaactaat gcacacactc 780
cacctgtatt gcaccaagat aatgagggca tcgtcttggc gcgtcttggc gagagccgtg 840
tttcgtgacg caatcagagc agtttctgga tagtatcttg tccagaaaca cgatataaac 900
cccatcgacg ggcccgttga agagcaccaa cccactatcc aatcctccaa tccaaca 957

<210> 6

<211> 317

<212> DNA

<213> XPR2 terminator

<400> 6

agcttaacag atagtttgcc ggtgataatt ctcttaacct cccacactcc tttgacataa 60
cgatttatgt aacgaaactg aaatttgacc agatattggt gtaaatagaa aatctggctt 120
gtagggtggca aaatcccgtc tttgttcgtc gggtccctct gtgactgctc gtcgtccctt 180
tgtgttcgac tgtcgtgttt tgttttccgt gcgtgcgcaa gtgagatgcc cgtgttcgaa 240
ttcggtagtc gcacggacca tcggttgctc tgcacacaca cacacgcgag gctggaacct 300
acatcagagc actactt 317

<210> 7

<211> 218

<212> PRT

<213> TIMP-2 protein

<400> 7

Met Gly Ala Ala Ala Arg Thr Leu Arg Leu Ala Leu Gly Leu Leu Leu
1 5 10 15
Pro Leu Leu Arg Pro Ala Asp Ala Cys Ser Cys Ser Pro Val His Pro
20 25 30
Gln Gln Ala Phe Cys Asn Ala Asp Val Val Ile Arg Ala Lys Ala Val
35 40 45
Ser Glu Lys Glu Val Asp Ser Gly Asn Asp Ile Tyr Gly Asn Pro Ile
50 55 60
Lys Arg Ile Gln Tyr Glu Ile Lys Gln Ile Lys Met Phe Lys Gly Pro
65 70 75 80
Glu Lys Asp Ile Glu Phe Ile Tyr Thr Ala Pro Ser Ser Ala Val Cys
85 90 95
Gly Val Ser Leu Asp Val Gly Gly Lys Lys Glu Tyr Leu Ile Ala Gly
100 105 110
Lys Ala Glu Gly Asp Gly Lys Met His Ile Thr Leu Cys Asp Phe Ile
115 120 125
Val Pro Trp Asp Thr Leu Ser Thr Thr Gln Lys Lys Ser Leu Asn His

130 135 140
 Arg Tyr Gln Met Gly Cys Glu Cys Lys Ile Thr Arg Cys Pro Met Ile
 145 150 155 160
 Pro Cys Tyr Ile Ser Ser Pro Asp Glu Cys Leu Trp Met Asp Trp Val
 165 170 175
 Thr Glu Lys Asn Ile Asn Gly His Gln Ala Lys Phe Phe Ala Cys Ile
 180 185 190
 Lys Arg Ser Asp Gly Ser Cys Ala Trp Tyr Arg Gly Ala Ala Pro Pro
 195 200 205
 Lys Gln Glu Phe Leu Asp Ile Glu Asp Pro
 210 215

<210> 8
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> primer
 <400> 8
 ccctgtcaga tatcgtgag 19
 <210> 9
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> primer
 <400> 9
 ggccagaacg gcagtgag 18
 <210> 10
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> primer
 <400> 10
 actgccgttc tggcctgcag ctgctccccg gtg 33
 <210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> primer
 <400> 11
 cgttgaagct ttgcttatgg 20
 <210> 12
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> primer
 <400> 12
 aggcacagca gcaggggc 18
 <210> 13
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> primer
 <400> 13
 cctgctgctg tgccttgcag ctgctccccg gtg 33
 <210> 14
 <211> 20
 <212> DNA

<213>	primer	
<400>	14	
	tcgcttggca ttagaagaag	20
<210>	15	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	primer	
<400>	15	
	tetaatgcc aagcatgcag ctgctccccg gtg	33